

Trabalho académico de investigação

**CARATERIZAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO RELATIVA
DE CÉLULAS NEUROENDÓCRINAS NO JEJUNO-ÍLEO**

Tiago André Pereira Guedes

Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP e HSA/CHP

Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC)

Responsável: Prof. Doutora Margarida Lima, HSA/CHP e ICBAS/UP

Orientador: Prof. Doutora Mariana Monteiro, ICBAS/UP

PREÂMBULO

Este trabalho, apresentado para fins de obtenção do grau de Mestre em Medicina, integra um projeto desenvolvido no âmbito da Disciplina de Iniciação à Investigação Científica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP) e do Centro Hospitalar do Porto (CHP) e está estruturado em duas partes: proposta de projeto de investigação e respetivo relatório de execução.

A proposta de projeto foi elaborada durante o ano letivo 2011/2012 e o projeto foi executado na sua grande parte durante o ano letivo 2012/2013.

O projeto foi executado no Departamento de Anatomia do ICBAS/UP com a colaboração do Departamento de Patologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal – Delegação Norte, sob a orientação da Prof. Doutora Mariana Monteiro, com a supervisão da Prof. Doutora Margarida Lima, responsável pela DIIC.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Mariana Monteiro, um exemplo inspirador e motivador na prática de investigação científica aliada ao exercício médico. Agradeço-lhe toda a orientação, todo o apoio, entusiasmo e disponibilidade que sempre teve para comigo. Muito obrigado Professora.

À Prof. Doutora Margarida Lima pelo incansável acompanhamento e supervisão ao longo de todo este projeto. Agradeço-lhe ainda o forte empenho na formação pré-graduada na área da investigação clínica, oportunidade única, que será certamente uma mais-valia no meu futuro profissional.

Ao Prof. Doutor Artur Águas por me ter recebido de portas abertas no Departamento de Anatomia, ainda durante o meu 3º ano de curso, e de ter permitido a realização deste trabalho no mesmo.

Ao Prof. Doutor Agostinho Santos por me ter consentido a participação nas rotinas do Departamento de Patologia Forense do INML para a colheita das amostras, indispensável a este trabalho.

À Madalena Costa e à Ana Pinto por toda a paciência e auxílio que sempre me prestaram relativamente às técnicas laboratoriais.

À Sofia Martins, Sofia Pereira e Tiago Morais por todo o companheirismo e ajuda que me concederam com a análise histológica, estatística e elaboração do documento final.

À Dr^a Marta Santos pelo apoio prestado na interpretação microscópica do tecido intestinal, instrução que em muito facilitou o decorrer da análise morfométrica efetuada.

Ao Dr. Mário Nora por inicialmente me ter permitido assistir a cirurgias bariátricas o que possibilitou uma melhor compreensão das suas técnicas e variações.

Aos meus Pais, por me apoiarem incondicionalmente. É a vós que tudo devo.

RESUMO

Introdução: O sistema incretínico tem sido implicado como um dos principais mecanismos envolvidos na remissão da diabetes após a cirurgia bariátrica. As células incretínicas produzem o polipéptido insulínico dependente da glucose (GIP) e o péptido semelhante ao glucagon tipo 1 (GLP-1), estimuladores fisiológicos da secreção de insulina com um importante papel na homeostasia da glucose e no tratamento da diabetes tipo 2. No entanto, a distribuição das células neuroendócrinas produtoras de incretinas ao longo do intestino delgado era previamente desconhecida.

Objetivo: O nosso objetivo foi caracterizar a frequência das células produtoras de incretinas ao longo do intestino delgado humano e correlacionar os nossos dados com o comprimento do intestino delgado, índice de massa corporal, idade e sexo.

Métodos: Intestinos delgados (n=30) foram colhidos em autópsias médico-legais, tendo-se amostrado fragmentos a cada 20 cm ao longo de todo o comprimento de intestino delgado. Foram construídos *Tissue Microarrays*, contendo cilindros de todas as amostras, de forma a analisar a expressão de GLP-1, GIP, Cromogranina A por técnicas de marcação imunohistoquímica quantificada por ferramentas de análise computadorizada com recurso a microscopia ótica.

Resultados: A percentagem de área intestinal marcada para as células imunoreativas para o GLP-1 mostrou ser significativamente superior a partir dos 200 cm distais ao ligamento de Treitz, sendo particularmente diferente entre o intervalo 300–500 cm em comparação com os primeiros 80 cm do intestino delgado. A expressão de GIP foi superior nos primeiros 80 cm, enquanto a Cromogranina A foi constante ao longo de todo o intestino delgado.

Conclusões: As diferenças observadas na frequência das células intestinais produtoras de GLP-1 ao longo do intestino delgado podem possivelmente explicar a elevada secreção incretínica associada à chegada precoce de nutrientes ao jejuno proximal, sendo consistente com o aumento da remissão de diabetes observada nos doentes submetidos a *bypass* gástrico metabólico com a criação de uma ansa biliopancreática de 200 cm.

Palavras-chave: Incretinas, GIP, GLP-1, Imunohistoquímica, Morfometria, Diabetes tipo 2, Cirurgia bariátrica

ABSTRACT

Introduction: Incretins have been implicated as the key mechanism responsible for diabetes remission after bariatric surgery. Incretin cells produce glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) that are physiological stimulants of insulin release with an important role in glucose homeostasis and in type 2 diabetes treatment. However the distribution of incretin secreting neuroendocrine cells along the small intestine was previously unknown.

Aim: Our aim was to characterize the frequency of incretin producing cells along the human small intestine and correlate our putative data with the length of the small intestine, body mass index, age and sex.

Methods: Small intestines (n=30) have been harvested from forensic autopsies and tissue fragments were collected every 20 cm along all of the small intestine length. Tissue microarrays containing cores from all samples were constructed to analyze by light microscopy the expression of GLP-1, GIP and chromogranin A by immunohistochemical staining that was quantified by a computerized analysis tool.

Results: The percentage of intestine stained area for GLP-1 immunoreactive cells was found to be significantly higher 200 cm from the Treitz ligament onwards, being particularly different between the 300 – 500 cm interval of the gut in comparison to the first 80 cm of small intestine. GIP was predominantly expressed in the first 80 cm, while chromogranin A expression was constant along all of the small intestine.

Conclusions: The uneven frequency of intestinal GLP-1 cells could be a possible explanation for early higher incretin secretion that is associated with early arrival of nutrients to the proximal jejunum and is consistent with the increase in diabetes remission observed in patients submitted to metabolic gastric bypass with the creation of a 200 cm biliopancreatic limb.

Keywords: Incretins, GIP, GLP-1, Immunohistochemistry, Morphometry, Type 2 Diabetes, Bariatric surgery

ÍNDICE

PROPOSTA DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO-PLANO CIENTÍFICO..... 8

INTRODUÇÃO	9
PROBLEMAS	16
HIPÓTESES DE TRABALHO	16
OBJETIVOS DO ESTUDO	16
INTERVENIENTES.....	16
Instituições, Departamentos e Serviços	16
Equipa de Investigação	16
Constituição	16
Funções e Responsabilidades	17
Tempo dedicado ao projeto.....	17
Condições e motivações para a realização do estudo	18
METODOLOGIA.....	18
Desenho do estudo	18
Fases do estudo.....	18
Universo, população e amostra.....	18
Seleção dos participantes	18
Plano de trabalho	19
Lista de tarefas.....	19
Descrição das tarefas.....	19
Material e Métodos.....	20
Cadáveres e Colheita da Amostra	20
Preparação do Tecido	20
Imunohistoquímica	21
Análise Morfométrica.....	21
Análise de dados.....	21
Calendarização	21
INDICADORES DE PRODUÇÃO.....	22

PROPOSTA DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO-QUESTÕES ÉTICAS..... 23

PROPOSTA DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO-PLANO FINANCEIRO 25

ORÇAMENTO	26
FINANCIAMENTO	28

GLOSSÁRIO	29
RELATÓRIO DE EXECUÇÃO	31
MÉTODOS	32
Colheita das amostras biológicas.....	32
Processamento das amostras.....	32
Técnica de <i>Tissue microarrays</i> (TMA'S)	32
Técnica de Imunohistoquímica (IHQ)	33
Processamento e análise dos resultados.....	34
Análise estatística	34
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

PROPOSTA DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO

PLANO CIENTÍFICO

INTRODUÇÃO

A participação do trato gastrointestinal na regulação da secreção endócrina é conhecida desde o início do século 20, quando foi descrito pela primeira vez o sistema enteroendócrino, como sendo constituído por um conjunto de células localizadas nas paredes intestinais e morfológicamente adaptadas à secreção de péptidos (1). Atualmente sabe-se que são expressos mais de 30 genes de hormonas intestinais e que existem mais de 100 péptidos bioativos distribuídos ao longo do trato gastrointestinal (2). As hormonas produzidas por estas células são capazes de influenciar o apetite, a saciedade, a ingestão alimentar, as secreções gástricas, pancreáticas e hepáticas, a motilidade gastrointestinal e a homeostasia e metabolismo da glucose (3). Uma das interações mais estudadas entre os fatores secretados pelo trato gastrointestinal e o sistema endócrino é o efeito incretina, que corresponde ao fenómeno de amplificação da secreção de insulina após a administração oral de glucose quando comparada com a sua administração endovenosa (4-6). Pensa-se que este efeito seja responsável por 50-70% da secreção de insulina observada após a ingestão de glucose, sendo esta secreção duas a três vezes superior relativamente à que ocorre perante a administração endovenosa em indivíduos saudáveis (7). Esta resposta varia proporcionalmente com a quantidade de glucose ingerida, garantindo excursões da glicemia pós-prandial semelhantes e limitadas (8).

Há estudos que sugerem que as hormonas incretinas mais importantes são o péptido semelhante ao glucagon tipo 1 (*glucagon-like peptide-1*, GLP-1) e o péptido insulínico dependente da glucose (antigamente denominado por péptido inibitório gástrico, *gastric inhibitory peptide*, GIP) (9). Estes péptidos são secretados por células pertencentes ao sistema enteroendócrino, sendo ambos membros da superfamília do péptido glucagon, possuindo assim algum grau de homologia na sua sequência de aminoácidos (7).

O GIP é um péptido produzido e libertado pelas células K encontradas ao longo da mucosa do intestino delgado (10), sendo a sua densidade máxima observada no duodeno (11). A sua secreção é principalmente feita pelo duodeno e jejuno proximal, em resposta à ingestão de carboidratos e lípidos de forma dose dependente (12). A interação do GIP com o seu recetor na célula beta-pancreática apresenta efeito insulínico para concentrações de glucose elevadas, normalmente acima de 5-6mM (90-108 mg/dl) (13). O GIP mostrou ainda exercer efeitos anti-apoptóticos sobre as células beta-pancreáticas através da sua ação supressora sobre alguns mediadores da apoptose como, por exemplo, a proteína caspase-3 (14). Além do pâncreas, o recetor do GIP é expresso ainda no trato gastrointestinal superior, adipócitos, córtex da glândula

adrenal, osso, hipófise e numa variedade de regiões cerebrais (12). Ao contrário do GLP-1, como falado mais à frente, o GIP não influencia a secreção de glucagon pelas células alfa-pancreáticas humanas e o esvaziamento gástrico (7). Relativamente aos efeitos do GIP sobre o metabolismo no tecido adiposo, atualmente desconhecem-se os mecanismos exatos, existindo no entanto alguma evidência que o GIP promove ações como o aumento da incorporação de ácidos gordos em triglicerídeos estimulada pela insulina, estimulação da atividade da lipoproteína lipase e a síntese de ácidos gordos (15). Apesar de estudos em ratinhos com deleção do gene codificante para o recetor do GIP mostrarem que estes desenvolvem intolerância à glucose, outros estudos com recurso à imunoneutralização do GIP ou com um antagonista do seu recetor, um fragmento de GIP (GIP [7-30] amido), mostraram uma redução no efeito incretina de apenas 20-50%, sugerindo o GIP como não sendo o único responsável pelo efeito incretina (16, 17).

A outra hormona incretina, o GLP-1, é um produto do gene proglucagon, que codifica além do GLP-1, os péptidos glucagon, o péptido semelhante ao glucagon tipo 2 (*glucagon like peptide type 2*, GLP-2) e outros péptidos derivados (18). É sintetizado pelas células L, localizadas preferencialmente na mucosa da porção ileal do intestino delgado e na mucosa do cólon, originando-se do processamento pós-tradução (específico do tecido) do seu precursor, o proglucagon (19). Tal processamento origina como principais produtos nas células L o GLP-1, juntamente com o GLP-2 e a glicentina, enquanto no pâncreas endócrino o glucagon constitui o principal produto deste processamento (20). Apesar de estruturalmente homólogos o GLP-2 não partilha as mesmas ações biológicas com o GLP-1, atuando principalmente como regulador do crescimento no trato gastrointestinal (21). O GLP-1 é também expresso nas células alfa-pancreáticas e à semelhança do GIP vê ainda o seu recetor expresso em neurónios presentes em várias regiões cerebrais (21). O GLP-1 é secretado em duas formas bioativas, o GLP-1 [7-37] e o GLP-1 [7-36] amido que constitui a forma ativa predominante em circulação (7). As concentrações plasmáticas de GLP-1 aumentam cerca de 3 vezes do estado de jejum (cerca de 15 pmol/L) até ao estado pós-prandial (cerca de 40 pmol/L) (22), estando a sua secreção ao longo do dia relacionada com a libertação de insulina (23). À semelhança do GIP, o GLP-1 atua nas células beta-pancreáticas através do seu recetor acoplado à proteína G, estimulando a libertação dos grânulos de insulina (24). Pensa-se que o efeito insulínico do GLP-1 seja dependente dos níveis plasmáticos de glucose (25), não existindo nenhum efeito sobre a secreção de insulina para glicemias inferiores a aproximadamente 4,5mmol/L (81 mg/dl) (7). O GLP-1 é detetado na circulação sanguínea minutos após a ingestão alimentar, sugerindo esta rápida secreção a existência de um estímulo indireto mediado por fatores

neuronal e endócrino, despoletados pela presença de alimentos no trato gastrointestinal proximal, em detrimento de uma estimulação direta através do contacto das células L com os nutrientes (7). Apesar de os fatores relacionados com a rápida subida dos níveis de GLP-1 permanecerem largamente desconhecidos em humanos, estudos experimentais têm envolvido a inervação vagal (26) e os recetores muscarínicos M3 (21) bem como os recetores para o paladar (27) como alguns dos mediadores envolvidos. Além de estimular a secreção de insulina, o GLP-1 exerce ainda influência sobre as suas reservas promovendo a sua biossíntese bem como a sua expressão génica (28). O GLP-1 é capaz de suprimir a secreção de glucagon pelo tecido pancreático apesar de o mecanismo pelo qual o faz permanecer desconhecido, pensando-se que este efeito inibitório poderá ser indiretamente mediado através da libertação de insulina e da estimulação da secreção de somatostatina (18). Efeitos diretos sobre as células alfa-pancreáticas não são excluídos, uma vez que nessas células são também expressos recetores para o GLP-1 (29). Esta inibição da produção de glucagon mostra-se também dependente dos níveis plasmáticos de glucose, sendo improvável que o GLP-1 contrarie os efeitos reguladores do glucagon em presença de hipoglicemia (30). A par do GIP foram igualmente descritos efeitos diretos do GLP-1 no crescimento celular e sobrevivência das células beta-pancreáticas em modelos animais (31). Relativamente aos efeitos do GLP-1 a nível gastrointestinal, Nauck e colegas, mostraram que a administração de doses fisiológicas de GLP-1 a indivíduos saudáveis resultava numa lentificação do esvaziamento gástrico e absorção de glucose que poderia participar da subsequente redução dos níveis de glucose pós-prandiais (32). Estes dados sugerem que o GLP-1 faz parte de um fenómeno denominado de *ileal break* através do qual, os nutrientes presentes no segmento distal do intestino delgado induzem uma redução na motilidade e atividade secretora do trato proximal (33). Em condições fisiológicas é provável que os efeitos gastrointestinais do GLP-1, como a redução da secreção e esvaziamento gástrico, possam ser mais importantes que os insulínótrópicos (32). Em condições patológicas, como na diabetes, estes efeitos inibitórios do GLP-1 sobre o trato gastrointestinal são de particular interesse uma vez que contribuem potencialmente para a redução das excursões dos níveis de glucose pós-prandial (7). Relativamente aos efeitos sobre a ingestão alimentar, tem-se mostrado uma redução na ingestão calórica e um aumento da sensação de saciedade em estudos onde o GLP-1 foi administrado por via endovenosa em doses suprafisiológicas a indivíduos saudáveis (34), obesos e diabéticos (35, 36).

Os níveis circulantes de GIP e GLP-1 são muito baixos em estados de jejum, mas aumentam rapidamente após uma refeição verificando-se níveis de GLP-1 na linfa 5 a 6 vezes superiores aos níveis encontrados no plasma portal, sugerindo a via linfática como

o meio preferido de libertação do GLP-1 (37). A degradação das incretinas ocorre minutos após a sua libertação devido à enzima dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV) (38). A enzima é profusamente expressa podendo ser encontrada em vários tecidos e células como o sistema nervoso central, rim, pulmão, glândula adrenal, fígado, intestino, baço, testículos e pâncreas (39). A DPP-IV é ainda expressa na superfície de macrófagos, linfócitos e células endoteliais incluindo aquelas que revestem os vasos sanguíneos que drenam a mucosa intestinal e se encontram posicionados diretamente adjacentes aos sítios de secreção do GLP-1 (39). A enzima pode ainda encontrar-se como proteína solúvel na circulação sanguínea (40). A ação enzimática leva à formação de metabolitos inativos ou com fraca capacidade antagonista, sendo que a maioria do GLP-1 e GIP libertados na circulação portal é inativada pela DPP-IV sem chegar à circulação sistémica. Assim sendo, apenas uma pequena quantidade das incretinas produzidas é que consegue atingir as células beta-pancreáticas (7). A degradação rápida do GLP-1 secretado sugere que esta incretina exerça os seus efeitos antes de entrar nos capilares, reforçando as teorias que se baseiam na interação do GLP-1 com as fibras nervosas sensoriais aferentes resultando posteriormente numa modulação eferente vagal (7). Quando administrado por via endovenosa a indivíduos saudáveis e a diabéticos, o tempo de semi-vida plasmática do GIP é de 5-7 minutos, enquanto do GLP-1 é de 1-2 minutos (39, 40).

Os doentes diabéticos têm apresentado uma redução do efeito incretina (41, 42). As concentrações de GIP após a ingestão alimentar são elevadas (43), no entanto a resposta insulínica perante a administração exógena do mesmo mostrou ser 54% inferior em diabéticos quando comparada com a de indivíduos normais (44), sendo os mecanismos celulares precisos que contribuem para a resistência à ação do GIP ainda desconhecidos. Os níveis de GLP-1 em doentes diabéticos podem ser semelhantes (41), elevados (21) ou ainda diminuídos (45) comparativamente aos de indivíduos saudáveis. Ao contrário do GIP, a resposta insulínica ao GLP-1 está preservada nos indivíduos diabéticos, uma vez que a administração endovenosa de GLP-1 em indivíduos diabéticos diminui os níveis de glucose sanguínea em 3 a 4 horas (44). Estudos posteriores permitiram ainda verificar a permanência dos efeitos do GLP-1 na supressão da produção de glucagon e no atraso do esvaziamento gástrico (46).

A alteração dos níveis e atividade do sistema das incretinas foi identificado como um dos potenciais responsáveis pela remissão da diabetes associada à cirurgia bariátrica (47). A incidência da diabetes tem vindo a aumentar, estimando-se que cerca de um terço dos doentes sujeitos a cirurgia bariátrica sejam diabéticos (48). Atualmente a eficácia e segurança dos procedimentos bariátricos encontram-se bem documentados para indivíduos com um índice de massa corporal (IMC) superior a 35 kg/m² na presença de

comorbilidades e para indivíduos com IMC superior a 40 kg/m² com ou sem comorbilidades. No entanto, embora alguns estudos de pequenas dimensões sugiram que a cirurgia bariátrica também possa ter benefícios em indivíduos diabéticos com IMC inferior a 35 kg/m², a sua utilização com o objetivo de tratar a doença diabética carece ainda de evidências que permitam determinar a sua eficácia e segurança a longo prazo (49).

Uma das hipóteses avançadas para justificar a melhoria e remissão da diabetes após a cirurgia bariátrica centrou-se na restrição alimentar pós-cirúrgica seguida de uma rápida perda de peso (50). De acordo com esta hipótese as células beta-pancreáticas seriam menos estimuladas devido à diminuição da ingestão alimentar durante esse período, verificando-se posteriormente os efeitos sensibilizadores à insulina devidos à perda de peso resultante da cirurgia (50). Assim sendo, seria de esperar que os vários procedimentos em que se verificasse a privação alimentar pós-cirúrgica imediata, seguida de uma aquisição gradual de hábitos de dieta e que culminassem num período de perda de peso estável mostrassem resultados semelhantes. Contudo, a taxa de remissão da diabetes em doentes obesos submetidos a procedimentos bariátricos varia consoante o tipo de cirurgia efetuada. Uma meta-análise demonstrou que a taxa de remissão da diabetes é de cerca de 48% para a banda gástrica ajustável (BGA) – uma técnica meramente restritiva, 84% para o *bypass* gástrico em Y-de-Roux (BGRY) – uma técnica mista, e mais de 95% na derivação biliopancreática (DB) – uma técnica malabsortiva (51). Enquanto a remissão da diabetes após BGA ocorre geralmente semanas a meses depois da cirurgia, compatível com um aumento da sensibilidade à insulina associada à perda de peso, após o BGRY e a DB a melhoria e remissão da diabetes ocorre quase imediatamente após a cirurgia, muito antes de se verificar uma perda de peso significativa (52). O recurso a variações à técnica clássica do BGRY, com a utilização de uma ansa biliopancreática mais longa do que no BGRY clássico (200 cm vs. 70 cm), demonstrou taxas de remissão da diabetes superiores aos previamente descritos (53). Estes dados fizeram com que se colocasse em causa a existência de mecanismos alternativos que justificassem esta remissão (54). Uma das explicações possíveis para os efeitos da cirurgia bariátrica na homeostasia da glucose é a alteração da anatomia gastrointestinal através da criação de vias alternativas para os nutrientes ingeridos e a sua chegada precoce ao intestino distal, com a consequente hiperestimulação das células L, e aumento do GLP-1, péptido YY e oxintomodulina (47). Estes péptidos anorexigénicos e antidiabéticos participariam do fenómeno de *ileal break*, estando implicados na redução da motilidade gastrointestinal superior e da ingestão alimentar. A esta hipótese explicativa tem-se atribuído a designação de “hipótese do intestino distal” (50). Tendo em conta que a exclusão cirúrgica do intestino delgado proximal do trânsito

intestinal é uma característica comum aos procedimentos bariátricos com maior percentagem de remissão da diabetes, nomeadamente o BGRY e a DB, foi colocada outra hipótese alternativa para justificar a melhoria da diabetes. Nomeadamente, foi colocada a possibilidade de a exclusão do duodeno e do jejuno proximal do trânsito alimentar intestinal, prevenir a secreção de um suposto fator anti-incretina que promovesse a resistência à insulina e o desenvolvimento da diabetes (55, 56). Um estudo recente derivado da criação e aplicação de uma manga endoluminal, onde o trato proximal é seletivamente excluído da passagem alimentar até ao jejuno (mimetizando assim uma cirurgia do tipo BGRY) demonstrou uma redução no peso corporal, no consumo calórico diário e melhoria do estado glicémico em jejum e tolerância à glucose sem evidência de malabsorção (57). Perante esta hipótese de envolvimento dos componentes proximais atribui-se frequentemente o termo de “hipótese do intestino proximal” (50). Apesar de parecer contraditória a produção de fatores antagónicos pelo intestino proximal, alguns autores têm referido que o suposto efeito anti-incretina possa existir como mecanismo contra-regulador de forma a prevenir episódios de hipoglicemia induzidos pelo efeito incretina (58). Estes componentes contribuem em conjunto para um balanço conjugado que permite excursões de glucose sanguínea normais sendo que modificações deste equilíbrio através da exclusão do intestino proximal, por exemplo, por procedimentos bariátricos, poderia hipoteticamente estar na origem de situações de hiperinsulinemia, hipoglicemia e algumas complicações raras do BGRY como a nesidioblastose (59).

Tendo em conta o papel das incretinas no metabolismo da glucose e na melhoria ou remissão da diabetes após a realização de algumas técnicas de cirurgia bariátrica, importa conhecer a distribuição detalhada das células produtoras de GLP-1 e GIP no intestino delgado de modo a propor otimizações das técnicas cirúrgicas, de forma a melhorar os resultados metabólicos das mesmas sem o risco de induzir malabsorção excessiva. Estudos realizados até à data com recurso a intestino de outros animais e biópsias cirúrgicas de intestino delgado de humanos e através da utilização de técnicas de imunohistoquímica demonstraram que as células L produtoras de GLP-1 se localizavam principalmente no íleo e cólon (60), enquanto as células K produtoras de GIP se localizavam principalmente no duodeno (11). Estudos mais recentes identificaram no entanto uma população de células L/K capaz de secretar ambos GIP e GLP-1 (10, 61). No entanto, a pesquisa sistemática da distribuição relativa das células neuroendócrinas produtoras de GLP-1 e GIP ao longo do intestino delgado humano é desconhecida.

O principal objetivo deste estudo consiste em avaliar detalhadamente a quantidade e distribuição relativa das células neuroendócrinas produtoras de GLP-1 e GIP ao longo do intestino delgado, assim como a sua correlação com os dados antropométricos, em

particular o comprimento do intestino delgado, o IMC e o sexo. Os dados resultantes deste estudo poderão contribuir para explicar os potenciais mecanismos de remissão da diabetes associados à cirurgia ou mesmo propor alterações às técnicas atualmente realizadas com o objetivo de melhorar os seus resultados.

PROBLEMAS

O comprimento, distribuição e proporção relativa das células neuroendócrinas produtoras de GLP-1 e GIP no jejuno-íleo são atualmente desconhecidos e poderão ter implicações práticas na clínica médica e cirúrgica, em particular no domínio da cirurgia da obesidade e da remissão da diabetes.

HIPÓTESES DE TRABALHO

Verificar possível correlação entre a quantidade e distribuição relativa de células neuroendócrinas com o comprimento do intestino delgado, IMC e o sexo.

OBJETIVOS DO ESTUDO

O principal objetivo deste estudo consiste em avaliar sistematicamente a quantidade e distribuição relativa das células neuroendócrinas produtoras de GLP-1 e GIP ao longo do intestino delgado, assim como a sua correlação com os dados antropométricos, em particular o comprimento do intestino delgado, o IMC e o sexo.

INTERVENIENTES

Instituições, Departamentos e Serviços

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS-UP), Departamento de Anatomia

Instituto Nacional de Medicina Legal (INML) – Delegação Norte, Departamento de Patologia Forense

Equipa de Investigação

Constituição:

Aluno:

Tiago Guedes: Aluno da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP

Orientador do projeto:

Mariana Monteiro, MD, PhD, Endocrinologista, Professora Associada de Anatomia Humana, Departamento de Anatomia, ICBAS-UP. Regente de Anatomia Sistemática II.

Supervisor da DIIC:

Margarida Lima: MD, PhD, Imunohemoterapeuta, Assistente Hospitalar Graduada, SHC do HSA/CHP; Professora Auxiliar Convidada do ICBAS-UP. Regente da DIIC.

Outros investigadores:

Agostinho Santos, MD, PhD, Professor Auxiliar Convidado, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Madalena Costa, Técnica de Anatomia Patológica Citológica e Tanatológica, Departamento de Anatomia, ICBAS-UP

Ana Pinto, Técnica Profissional, Departamento de Anatomia, ICBAS-UP

Funções e Responsabilidades:

A conceção e elaboração da proposta e a execução do projeto são da responsabilidade do Aluno;

Os Orientadores acompanharão o aluno na elaboração de proposta, na execução do projeto e na análise e interpretação dos resultados;

A Regente da DIIC supervisionará todas as fases do projeto, desde a sua conceção até à apresentação dos resultados, passando pela sua execução e análise/interpretação dos dados;

Os restantes investigadores colaborarão em aspectos específicos do projeto, conforme especificado adiante.

Tempo dedicado ao projeto:

Nome e apelido	Função	% Tempo de dedicado ao projeto	Nºde meses	Pessoas * Mês
Tiago Guedes	Aluno	10	22	2,20
Mariana Monteiro	Orientador	2,5	22	0,55
Margarida Lima	Supervisor	2,5	22	0,55
Agostinho Santos	Supervisor	2,5	22	0,55
Madalena Costa	Técnica	2,5	22	0,55
Ana Pinto	Técnica	2,5	22	0,55
Total				4,95

Condições e motivações para a realização do estudo:

O estudo proposto será realizado com uma equipa experiente no âmbito da investigação laboratorial nomeadamente na área da endocrinologia e controlo do apetite, sob a orientação da Prof. Doutora Mariana Monteiro.

METODOLOGIA

Desenho do estudo

Tipo de estudo:

Estudo unicêntrico, transversal, observacional, de carácter laboratorial.

Fases do estudo

O estudo será desenvolvido em quatro fases:

Colheita de amostras de intestino delgado juntamente com dados demográficos e antropométricos durante autópsias médico-legais.

Processamento das amostras de acordo com os métodos de rotina para avaliação por microscopia óptica e ainda através do recurso a técnicas de imunohistoquímica.

Análise microscópica das peças quanto à sua histomorfologia de jejuno-íleo bem como quanto à distribuição e quantidade das células neuroendócrinas, em particular, as produtoras de GLP-1 e GIP.

Tratamento estatístico dos dados recolhidos

Universo, população e amostra

Universo:

Cadáveres de indivíduos adultos.

População:

Cadáveres de indivíduos adultos recebidos no INML, Delegação Norte.

Amostra:

Amostras de intestino delgado, em amostragens de 20 em 20 cm.

Seleccção dos participantes

Critérios de inclusão:

Todos os cadáveres com mais de 18 anos de idade, sem patologia crónica conhecida (doença hepática ou oncológica).

Critérios de exclusão:

Sinais de putrefação major do intestino delgado.

Plano de trabalho

Tarefas associadas ao projeto:

Colheita de amostras biológicas de intestino delgado em autópsias médico-legais

Processamento das amostras e preparação para análise histológica

Análise histológica

Tratamento de dados

Lista de tarefas

Durante a execução do projeto estão previstas as seguintes tarefas:

Nº da tarefa	Designação da tarefa	Data de início (dia/mês/ano)	Data de conclusão (dia/mês/ano)
#1	Colheita de amostras	Outubro 2011	Junho 2012
#2	Processamento das amostras	Outubro 2011	Junho 2012
#3	Análise Histológica	Setembro 2012	Outubro 2012
#4	Tratamento de dados	Outubro 2012	Outubro 2012

Descrição das tarefas

Tarefa 1: Colheita de amostras.	
Duração:	8 meses
Data prevista para o início:	10.10.2011
Data prevista para a conclusão:	29.06.2012
Instituições, Departamentos e Serviços:	INML, Delegação do Norte, Departamento de Patologia Forense
Objetivos e descrição:	Colheita de amostras de intestino delgado humano.
Investigadores envolvidos, funções e responsabilidades	Tiago Guedes, Agostinho Santos: Colheita de material biológico.
Tarefa 2: Processamento Amostra	
Duração	8 meses
Data prevista para o início:	11.10.2011
Data prevista para a conclusão:	30.06.2012
Instituições, Departamentos e Serviços:	ICBAS, Departamento de Anatomia
Objetivos e descrição:	Preparação das amostras para análise histológica por microscopia óptica: Inclusão em parafina, Coloração com Hematoxilina-Eosina (H&E). Coloração imunocitoquímica. Construção de <i>TissueMicroarray</i> .
Investigadores envolvidos, funções e responsabilidades:	Madalena Costa, Ana Pinto: Execução das técnicas mencionadas.
Tarefa 3: Análise Histológica	
Duração:	1 mês
Data prevista para o início:	Setembro 2012
Data prevista para a conclusão:	Outubro 2012
Instituições, Departamentos e Serviços:	ICBAS, Departamento de Anatomia
Objetivos e descrição:	Estudos morfométricos

Investigadores envolvidos, funções e responsabilidades:	Tiago Guedes, Madalena Costa, Ana Pinto: Execução dos estudos morfométricos.
Tarefa 4: Tratamento de dados.	
Duração:	1 mês
Data prevista para o início:	Outubro 2012
Data prevista para a conclusão:	Outubro 2012
Instituições, Departamentos e Serviços:	ICBAS, Departamento de Anatomia
Objetivos e descrição:	Tratamento estatístico dos dados obtidos na Tarefa 1 e 3
Investigadores envolvidos, funções e responsabilidades:	Tiago Guedes, Mariana Monteiro: Tratamento estatístico dos dados

Material e Métodos

Cadáveres e Colheita da Amostra

Serão utilizados unicamente cadáveres com mais de 18 anos de idade, sem patologia crónica conhecida (doença hepática ou oncológica) e sem sinais de putrefação maior do intestino delgado ao momento da autópsia.

Após a exposição intestinal será efetuado o reconhecimento do ligamento de Treitz e removido o intestino delgado em fita desde a válvula íleo-cecal até ao ligamento de Treitz. Serão efetuadas duas medições do intestino delgado com uma régua graduada ao milímetro de 10 cm. Na altura da segunda medição o intestino delgado será amostrado em todo o seu diâmetro, de 20 em 20 cm, com a primeira amostra correspondendo ao local de reconhecimento do ligamento de Treitz e a última à amostra mais próxima possível da válvula íleo-cecal. Os fragmentos recolhidos serão colocados em soluções de formol tamponado e enviados para o laboratório. Serão unicamente registados, relativamente ao cadáver, a data da colheita, número da autópsia, sexo, idade, estatura, peso e o comprimento obtido desde o ligamento de Treitz até à válvula íleo-cecal.

Preparação do Tecido

Os fragmentos de intestino delgado colhidos serão mantidos em solução de formol tamponado durante 24h. Seguidamente serão realizados cortes transversais com cerca de 0.3 cm em largura resultando em fragmentos para posteriormente incluir em parafina.

De cada bloco de parafina será obtida uma lâmina corada com H&E para o reconhecimento do local histológico de interesse. Desse local será removido um cilindro de tecido (com diâmetro aproximado de 0.6-2.0mm) que será colocado num bloco recetor para a construção de um *Tissue microarray* (TMA). O processo repetir-se-á para os outros blocos dadores construindo-se assim num bloco recetor uma matriz conjunta de cilindros de tecidos. O bloco recetor será subsequentemente cortado e analisado por imunohistoquímica.

Imunohistoquímica

Através de corte do bloco de TMA serão produzidas secções de 4 µm de espessura. As lâminas obtidas serão incubadas em peróxido de hidrogénio para eliminação da atividade da peroxidase endógena, seguido da incubação sequencial com anticorpos primários (anti-GLP1, anti-GIP, anti-cromogranina, anti-sinptofisina), secundários, conjugados peroxidase-streptavidina e substrato cromogénico com produção final de produtos colorimétricos que serão analisados de forma morfométrica.

Análise Morfométrica

As lâminas histológicas serão observadas com recurso ao microscópio óptico com câmara fotográfica digital acoplada e ligada a um computador. Cada fotografia será submetida a análise de contagem de pixéis através de software próprio.

Análise de dados

Os dados colhidos na altura da autópsia são a idade, sexo, comprimento do intestino delgado e índice de massa corporal.

Serão apresentadas medidas de tendência central como a média e medidas de dispersão ou variação como o desvio padrão e o erro padrão da média.

Calendarização

Duração

Global: 22 meses

Datas de início e conclusão:

Global: Setembro de 2011 a Julho de 2013

Planeamento: Setembro de 2011 a Julho de 2012

Execução: Outubro de 2011* a Outubro de 2012

* A colheita de amostras de cadáveres foi iniciada no INML, Delegação do Norte, após as autorizações necessárias.

Cronograma global das atividades:

	ANO LECTIVO 2011/2012													ANO LECTIVO 2012/2013											
Mês	9	0	1	2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	1	2	3	4	5	6	7		
Escolha da área	X																								
Integração na equipa	X																								
Escolha do tema e do assunto	X																								
Identificação dos problemas		X																							

PROPOSTA DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO

QUESTÕES ÉTICAS

Foi pesquisado para todos os cadáveres o estado de inscrição no Registo Nacional de Não Dadores.

Foram obtidas todas as autorizações no Instituto Nacional de Medicina Legal para o procedimento das colheitas em cadáveres.

Todas as amostras e dados recolhidos durante a autópsia médico-legal são anonimizados, estando apenas associados ao número de autópsia.

As amostras de intestino delgado serão armazenadas no Departamento de Anatomia do ICBAS-UP.

No estudo não participam doentes nem profissionais do CHP.

PROPOSTA DO PROJETO DE INVESTIGAÇÃO

PLANO FINANCEIRO

ORÇAMENTO

Não serão efetuadas consultas, internamentos, exames complementares de diagnóstico no CHP, especificamente no âmbito do projeto.

	Custo estimado (€)
Reagentes e material consumível de laboratório *ver tabela seguinte	3649,81
Impressão de poster para apresentação de resultados	50,00
Inscrição aluno em congresso médico	200,00
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00
TOTAL	€3.949,81

Reagentes e material consumível							
Finalidade	Designação	Fabricante	Referência	Preço unitário (€)	Nº unidades	Preço (€) Sem IVA	Total (€) Sem IVA
Imunohistoquímica	Ac Anti-Sinaptofisina	Abcam	Ab53166	370,00	2	740,00	3649,81
	Ac Anti-CromograninaA	Abcam	Ab17064	360,00	1	360,00	
	Ac Anti-GLP1	Abcam	Ab22625	370,00	1	370,00	
	Ac Anti-GIP	Abcam	Ab30679	360,00	1	360,00	
	Kit ABC	Baptista Marques	PK 6100	550,00	1	550,00	
	Reagente DAB (3,3'-diaminobenzidina)	Dako	K3468	220,00	1	220,00	
	Polisorbato 20 (Tween20)	SIGMA	P1379-500ml	42,30	1	42,30	
	Solução tampão PBS	Gibco	70011-051	356,35	1	356,35	
	Peróxido de Hidrogénio	Merck	1.07210.0250	27,95	1	27,95	
	Soro Coelho	Dako	X0902	109,36	1	109,36	
	Soro Porco	Dako	X0901	77,00	2	77,00	
	Caneta Hidrofóbica (Dako Pen)	Dako	52002	153,75	1	153,75	
	Pontas de pipeta automática	Gilson	D10	22,50	1	22,50	

	Pontas de pipeta automática	Gilson	D200	18,00	1	18,00	
	Pontas de pipeta automática	Gilson	D1000	18,00	1	18,00	
	Lâminas	VWR		2,00	24	48,00	
	Lâminas Histobound	VWR		26,20	5	131,00	
	Lamelas	VWR		3,80	12	45,60	

Estimativa das quantidades tendo em conta: São esperadas colheitas de 30 cadáveres; Esperadas **240 lâminas de TMA** (cada uma comporta 20 amostras; 1 conjunto de 60 lâminas para cada anticorpo).

Custos efetivos para a realização de trabalho:

Reagentes e material consumível							
Finalidade	Designação	Fabricante	Referência	Preço unitário (€)	Nº unidades	Preço (€) Sem IVA	Total (€) Sem IVA
Imunohistoquímica	Ac Anti-Sinaptofisina	Abcam	Ab53166	370	2	740	10676,8
	Ac Anti-CromograninaA	Abcam	Ab17064	360	1	360	
	Ac Anti- GLP1	Abcam	Ab22625	370	1	370	
	Ac Anti-GIP	Abcam	Ab30679	360	1	360	
	Ac Anti-Sinaptofisina (pronto a usar)	Menarini	PA0299	135	2	270	
	Novolink polymer kit	Menarini	RE7150-k	665	1	665	
	BSA	Sigma	A2153-100G	366,5	1	366,5	
	Metanol	VWR	1.060.121.000	41,6	3	124,8	
	Kit ABC	Baptista Marques	PK 6100	550	1	550	
	Reagente DAB(3,3'-diaminobenzidina)	Dako	K3468	220	1	220	
	Ácido citrico	VWR	1.002.441.000	58,2	1	58,2	
	Polisorbato 20 (Tween20)	SIGMA	P1379-500ml	42,3	1	42,3	
	Solução tampão PBS	Gibco	70011-051	356,35	1	356,35	
	Peróxido de Hidrogénio	Merck	1.072.100.250	27,95	1	27,95	
	Soro Coelho	Dako	X0902	109,36	1	109,36	
	Soro Porco	Dako	X0901	77	2	77	
	Caneta Hidrofóbica (Dako Pen)	Dako	52002	153,75	1	153,75	
	Pontas de pipeta automática	Gilson	D10	22,5	1	22,5	
	Pontas de pipeta automática	Gilson	D200	18	1	18	
	Pontas de pipeta automática	Gilson	D1000	18	1	18	
	Lâminas	VWR		2	12	24	
	Lâminas Super frost	VWR	631-9483	22,3	15	334,5	

	Lamelas	VWR		3,8	6	22,8
HE	Eosina alcoolica	VWR	6766008	115	1	115
	Hematoxilina	VWR	105175250 0	124	1	124
	Lâminas	VWR		2	12	24
	Lamelas	VWR		3,8	6	22,8
Processa mento de amostras	Xilol (190L)	VWR	108661919 0	3570	1	3570
	Formol (25L)	VWR	361368M	156	6	936
	Álcool AGA 99% - 1L	AGA		3,96	150	594

FINANCIAMENTO

Não há despesas para o CHP.

O estudo será financiado por:

a) Verbas da Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB) e no âmbito do projeto de investigação do qual a Prof. Doutora Mariana Monteiro é investigadora principal.

b) Bolsa do ICBAS atribuída aos alunos da DIIC – 300,00 €

GLOSSÁRIO

ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

- BGA, Banda gástrica ajustável
- BGRY, *Bypass* gástrico em Y-de-Roux
- CHP, Centro Hospitalar do Porto
- DB, Derivação biliopancreática
- DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.
- DPP-IV, Dipeptidil-peptidase IV
- GIP, Péptido insulínico dependente da glucose ou péptido inibitório gástrico (*Gastric inhibitory peptide*)
- GLP-1, Péptido semelhante ao glucagon tipo 1 (*Glucagon-like peptide-1*)
- GLP-2, Péptido semelhante ao glucagon, tipo 2 (*Glucagon-like peptide-2*)
- HSA, Hospital de Santo António
- ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
- IHQ, Imunohistoquímica
- IMC, Índice de Massa Corporal
- INML, Instituto Nacional de Medicina Legal
- JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica
- MIM, Mestrado Integrado em Medicina
- PBS, Saline Buffered Phosphate
- PBS-T, Saline Buffered Phosphate com Tween 20 a 0,05%
- SHC, Serviço de Hematologia Clínica
- TMA, *Tissue microarray*
- UP, Universidade do Porto
- %AM, Percentagem de área marcada

RELATÓRIO DE EXECUÇÃO

MÉTODOS

Segue-se uma explicação mais detalhada e atualizada da metodologia usada no trabalho de investigação, relativamente à proposta apresentada.

Colheita das amostras biológicas

De acordo com o Protocolo estabelecido entre Instituto Nacional de Medicina Legal e ICBAS- Departamento Anatomia, ao abrigo do disposto no artigo 3º, nº 3, do Decreto – Lei nº 274/99, de 22 de Julho, foram recolhidos fragmentos do intestino delgado de 30 cadáveres, de fígado e de pâncreas. Os critérios de inclusão foram a idade superior a 18 anos, ausência de patologias crónicas (oncológicas ou hepáticas) conhecidas e ausência de evidentes sinais de putrefação major do intestino delgado aquando a autópsia. Durante a realização da autópsia o intestino delgado foi removido em fita, desde a válvula íleo-cecal até ao ligamento de Treitz. Após a remoção do intestino procedeu-se à medição e recolha de fragmentos do intestino delgado de 20 em 20 cm. Foram registados dados relativos à data de colheita, número da autópsia, sexo, idade, altura, peso e o comprimento do intestino delgado (desde o ligamento de Treitz até à válvula íleo-cecal).

Processamento das amostras

As amostras foram colocadas em formaldeído tamponado 4% (Panreac®) durante 24 horas, e processadas no laboratório do Departamento de Anatomia do ICBAS. Os 821 fragmentos de intestino delgado foram processados num processador automático (Shandon, Citadel 2000 *overnight*). Na inclusão (aparelho de inclusão Shandon-Histocentre), as amostras foram orientadas para que todas as camadas do intestino delgado estivessem representadas. Dos blocos de parafina efetuaram-se cortes (MicrótoMO Minot Leica®- RM2125RT) com 3 µm de espessura. Posteriormente foi realizada a coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E) em todas as lâminas.

Técnica de Tissue microarrays (TMA'S)

Procedeu-se à procura e marcação da mucosa intestinal nas lâminas de H&E e à criação de mapas sequenciais dos fragmentos representativos de todas as amostras de intestino de cada cadáver. Para a realização dos TMA's foi utilizado o Kit (Labvision Corporation), constituído por: um molde metálico utilizado para a construção do bloco de parafina (bloco recetor) com 24 x 2,0 mm e um instrumento usado para extrair um cilindro de tecido do bloco dador. Para a construção dos TMA's procedeu-se à realização dos blocos recetores utilizando molde metálico. De seguida realizou-se a transferência do

cilindro de mucosa intestinal (área previamente selecionada na lâmina) para o bloco recetor (de acordo com os mapas criados). Após a realização dos TMA's, os blocos foram homogeneizados na estufa a 60°C, seguido de um período de 24 horas na estufa a 37°C. Após 24 horas os blocos de TMA's foram colocados no frigorífico, envolvidos em parafilme. Os cortes histológicos foram realizados com a espessura de 3 µm em lâminas *Superfrost* (Thermo Scientific), seguindo os mapas, e colocadas posteriormente na estufa a 37°C, até a execução da técnica IHQ.

Técnica de Imunohistoquímica (IHQ)

Para a deteção por IHQ dos produtos de secreção das células K e L, respetivamente GIP e GLP-1, foram utilizados os anticorpos específicos: anti-GIP (Abcam-ab30679), anti-GLP-1 (Abcam – ab22625). Para a identificação global de células neuroendócrinas foram utilizados os anticorpos específicos anti-cromogranina A (Abcam-ab17064) e anti-sinaptofisina (Leica; RTU-SYNAP299).

Em todos os blocos de TMA foram utilizados controlos negativos e positivos, sendo utilizado o tecido hepático como controlo negativo e tecido pancreático (porção endócrina) como controlo positivo.

As lâminas foram desparafinadas e hidratadas. A recuperação antigénica para os anticorpos GIP e GLP-1, foi realizada no micro-ondas a 900W em tampão citrato 10mM (pH 6,0) com Tween 20 a 0,05% (20 minutos após a ferverdura); para os anticorpos sinaptofisina e cromogranina A, a recuperação antigénica, foi realizada na panela de pressão em solução tampão citrato 10mM (pH 6,0) com Tween 20 a 0,05% (3 minutos após o início da ferverdura). Após arrefecimento, foram realizadas duas lavagens em Saline Buffered Phosphate (PBS) com Tween 20 a 0,05% (PBS-T) (5 minutos). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogénio (Merck; 1.07210.0250) a 3% em metanol (20 minutos), seguido de lavagens em PBS-T (2x 5 minutos). Toda a IHQ foi realizada na Sequenza rack em Coverplates (TermoShandon). O bloqueio de reações inespecíficas para o anticorpo GIP foi utilizado o soro de coelho (DakoDenmark, 1:5 em Albumina sérica bovina (BSA) a 10% (30 minutos); para o anticorpo cromogranina A foi utilizado o soro de suíno (DakoDenmark; 1:5 em BSA a 10%) (30 minutos); para o anticorpo GLP-1 e sinaptofisina foi utilizado uma solução comercial (Leica-novocastra™, proteinblock, pronto a usar) (5 minutos), seguidos de lavagens com a solução tampão PBS-T (2x5 minutos). Seguidamente foi realizada a incubação com os respetivos anticorpos primários: anti-GLP-1 (Abcam-ab22625; policlonal; espécie coelho; diluição 1:4000 em BSA a 5%), anti-GIP (Abcam-ab30679; monoclonal; espécie ratinho; diluição 1:100 em BSA a 5%), anti-cromogranina A (Abcam ab17064; policlonal; espécie coelho; diluição 1:100 em BSA a 5%) e anti-sinaptofisina

(Leica; RTU-SYNAP-299; monoclonal; ratinho; pronto a usar), durante a noite, a 4°C. Após as lavagens com PBS-T (2x 5 minutos), foi utilizado o anticorpo secundário biotilado para o anti-cromogranina A (DakoDenmark; EO35301-2; policlonal; espécie de porco anti-coelho; diluição 1: 200 em BSA a 5%) e para o anti-GIP (DakoDenmark; EO35401-2; policlonal; espécie coelho anti-ratinho; diluição 1:200 em BSA a 5%) (30 minutos). Para os anti-GLP-1 e anti-sinaptofisina foi utilizada uma solução comercial após o anticorpo primário (Leica-novocastra™, postprimary, pronto a usar) (30 minutos). Após as lavagens com PBS-T (2x5 minutos), para o anti-cromogranina A e anti-GIP foi utilizado o complexo avidina-biotina (ABC) (Vector Laboratories; diluição 1:100 em BSA a 5%) (30 minutos); para anti-GLP-1 e anti-sinaptofisina foi utilizado o polímero da Leica-novocastra®, pronto a usar (30 minutos), as incubações foram à temperatura ambiente. Após as lavagens com PBS-T (2x5 minutos) foi utilizado o cromogénio Diaminobenzidina (3,3'-DAB) (Dako) (2 minutos). Seguido da contração nuclear com a hematoxilina de Harris (30 segundos), seguindo-se a lavagem em água corrente (15 minutos). Após a desidratação e diafanização, procedeu-se à montagem manual das lâminas utilizando como meio de montagem - Entellan, para posterior análise ao microscópio ótico (Zeiss; West Germany).

Processamento e análise dos resultados

Foram tiradas fotografias da mucosa intestinal utilizando a câmara (Leica; DFC290) acoplada ao microscópio ótico (Zeiss; West Germany), numa ampliação de 200x, utilizando o *software* de aquisição de imagens (Leica Qwin V3). As imagens foram processadas e analisadas segundo o *software* de processamento de imagens ImageJ Java Script. Este é um *software* em formato Java desenvolvido pelo U. S. National Institutes of Health (NIH) e pode ser obtido em <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>. Este programa permite a quantificação da percentagem de área marcada (pela técnica IHQ), retirando fatores como a subjectividade intra-observador ou inter-observadores. Assim pretende-se estabelecer, após a análise da percentagem de área marcada, uma razão entre a percentagem de marcação de células L/células K (detetadas pelos anticorpos anti-GIP e anti-GLP-1) e a percentagem de marcação das células neuroendócrinas (marcadas pelos anticorpos anti-sinaptofisina e anticromogranina A).

Análise estatística

Procedeu-se à análise descritiva da amostra com obtenção de medidas de tendência central (média) e erro padrão associado relativamente ao sexo, comprimento do intestino delgado e índice de massa corporal. A análise estatística para a comparação dos diferentes grupos foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido de um teste

pos-hoc de Dunns. Quando a comparação envolvia dois grupos independentes foi utilizado um teste Mann–Whitney U. Para verificar se existia a interação entre 2 fatores, foi usado um teste ANOVA multifatorial. A significância estatística foi assumida para $p < 0,05$ para todos os testes. Os dados foram analisados com recurso ao software Graphpad Prism 5.04 e IBM SPSS Statistics 21.0.

RESULTADOS

As amostras de intestino delgado aqui estudadas foram provenientes de cadáveres de adultos (n=30), dos quais 57% (n=17) eram de indivíduos do sexo masculino e 43% (n=13) eram do sexo feminino, com uma média de idade de $64,97 \pm 3,51$ anos e IMC médio de $25,80 \pm 3,94$ kg/m² e com a seguinte distribuição: 40% de indivíduos normoponderais (IMC < 25 kg/m²; n=12), 50% com excesso ponderal (IMC $\geq$ 25 e < 30 kg/m²; n= 15) e 10% de indivíduos obesos (IMC > 30 kg/m²; n=3) (Tabela 1). Não foram encontradas diferenças ou correlações entre o comprimento do intestino delgado, índice de massa corporal, sexo e idade.

Tabela 1. Características demográficas e antropométricas da amostra estudada.

Caraterísticas		Média± Erro Padrão da Média
Idade (anos)		64,97 ± 3,51
Homens / Mulheres		17:13 (56,70%:43,30%)
Peso Corporal (kg)		67,50 ± 2,18
IMC (kg/m ²)	Total	25,80 ± 0,72
	Homens	26,04 ± 1,38
	Mulheres	25,53 ± 0,75
	Normoponderais*	12 (40%)
	Excesso Ponderal*	15 (60%)
	Obesidade*	3 (10%)
Comprimento do Intestino (cms)		533,43 ± 18,11
Nº Fragmentos Recolhidos		27,37 ± 0,90

* Normoponderal – IMC < 25 kg/m²; Excesso Ponderal – IMC $\geq$ 25 kg/m² e < 30 kg/m²; Obesidade – IMC $\geq$ 30 kg/m²;

A presença de células neuroendócrinas e de células imunoreativas para as hormonas incretinas, GLP-1 e GIP, ao longo do intestino delgado do cadáver humano foi avaliada por técnicas de IHQ utilizando anticorpos específicos anti-cromogranina A, anti-GLP-1 e anti-GIP, respetivamente (Figura 1, 2, 3 e 4). A percentagem de área marcada (%AM) foi quantificada com recurso ao *software* ImageJ. Como marcadores

neuroendócrinos inespecíficos foram utilizados os marcadores cromogranina A e sinaptofisina, dos quais apenas foi utilizado para o estudo morfométrico o marcador cromogranina A, uma vez que os resultados da marcação com a sinaptofisina após otimização da técnica de IHQ não se revelaram satisfatórios, por persistir marcação de fundo inespecífica.

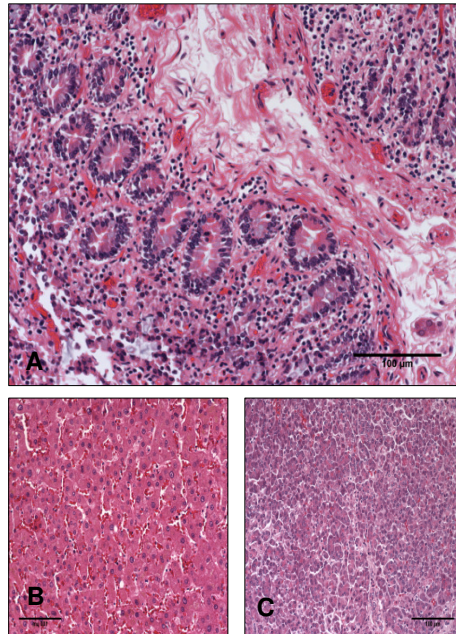


Figura 1. Imagem da coloração com Hematoxilina-eosina. **A-** Mucosa de intestino delgado; **B-** Fígado; **C-** Pâncreas.

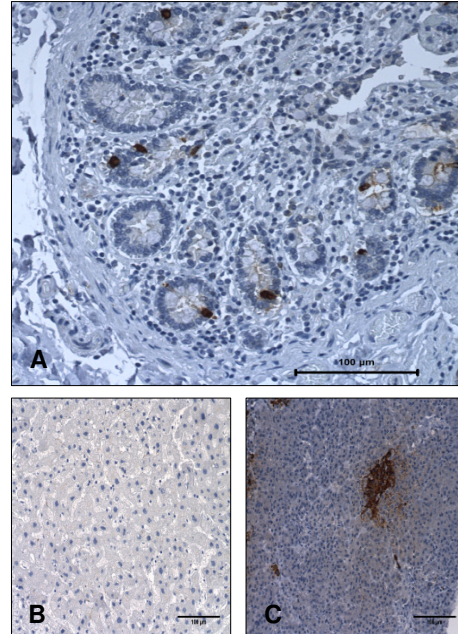


Figura 2. Imagem da técnica de imunohistoquímica para o anticorpo anti-Cromogranina A. **A-** Mucosa de intestino delgado; **B-** Controle negativo (fígado); **C-** Controle positivo (pâncreas). Ampliação 200x.

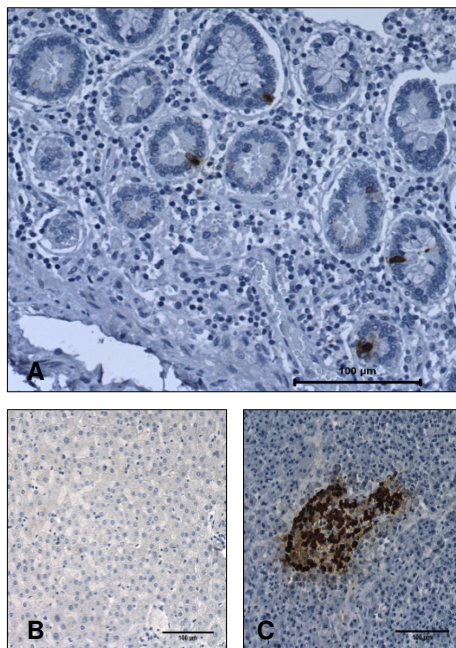


Figura 3. Imagem da técnica de imunohistoquímica para o anticorpo anti-GLP-1. **A-** Mucosa de intestino delgado **B-** Controle negativo (fígado); **C-** Controle positivo (pâncreas). Ampliação 200x.

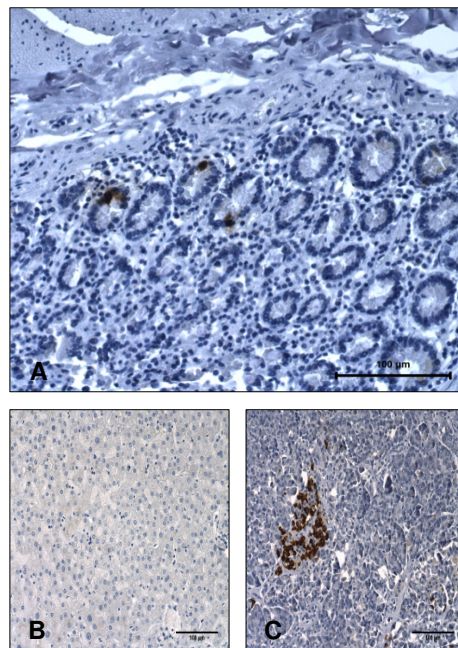


Figura 4. Imagem da técnica de imunohistoquímica para o anticorpo anti-GIP. **A-** Mucosa de intestino delgado **B-** Controle negativo (fígado); **C-** Controle positivo (pâncreas). Ampliação 200x.

A média da %AM foi analisada nos diferentes fragmentos de intestino delgado colhidos de 20 em 20 cm e, os resultados foram posteriormente, agrupados de 100 em 100 cm; e divididos em dois grupos: dos 0 aos 200 cm e dos 201 aos 700 cm, e ainda agregados e divididos em três grupos: dos 0 aos 80 cm, dos 81 aos 200 cm e dos 201 aos 700 cm, tendo os intervalos sido escolhidos em função das medidas de comprimento utilizadas na prática cirúrgica do *bypass* gástrico, na qual o *bypass* em Y-de-Roux clássico e o *bypass* gástrico metabólico com ansa longa incluem a criação de uma ansa biliopancreática de 70 cm ou 200 cm, respetivamente.

A análise da média da %AM para a cromogranina A não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) ao longo das amostras de intestino delgado (Gráfico 1A), assim como não revelou qualquer predominância de marcação em localização proximal ou distal, quando comparados os diferentes grupos (Gráfico 1B, 1C e 1D).

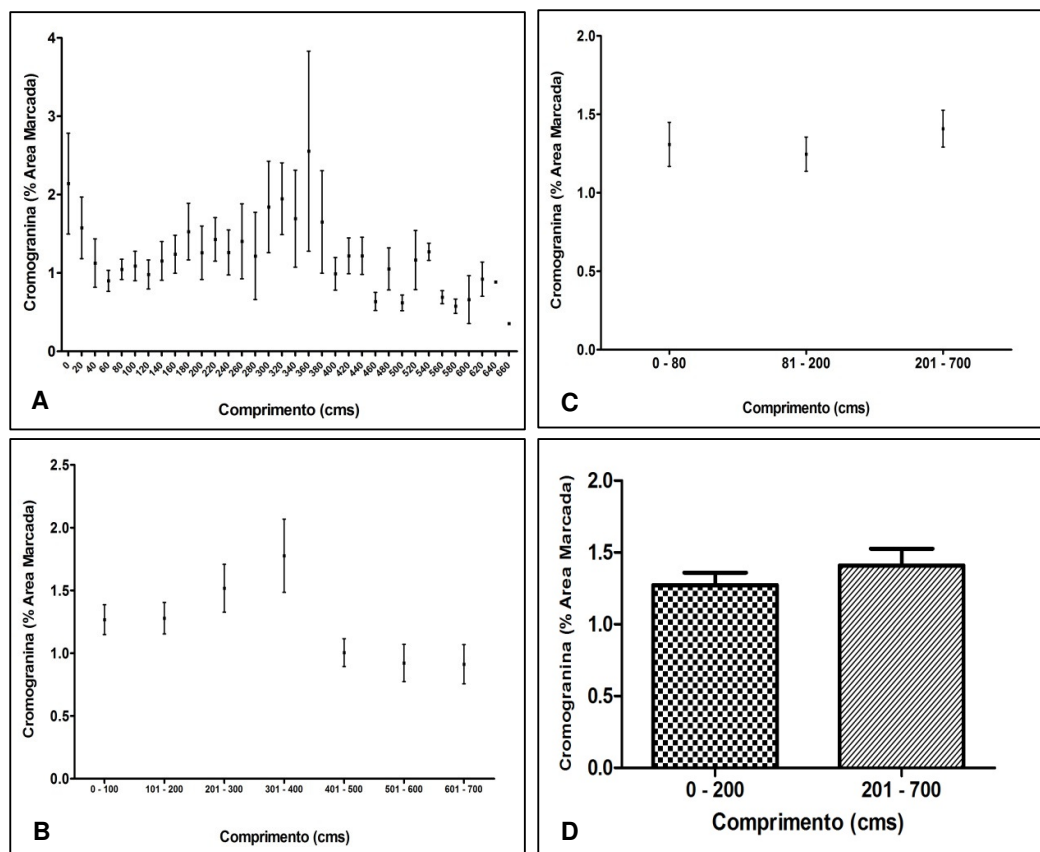


Gráfico 1. Percentagem de área marcada para a Cromogranina A. **1A-** Análise dos dados para os diferentes segmentos de intestino delgado de 20 em 20 cm. **1B-** Dados agrupados de 100 em 100 cm. **1C** – Dados agrupados: dos 0 aos 80 cm, dos 81 aos 200 cm e dos 201 aos 700 cm. **1D-** Dados agrupados: dos 0 aos 200 cm e dos 201 aos 700 cm.

Comparativamente à análise da %AM para o GLP-1 verificou-se que a expressão do GLP-1 aumentava de forma estatisticamente significativa ($p<0,01$) ao longo do intestino delgado, e que esta é significativamente maior aos 400 cm comparando com os 40 cm iniciais ($p<0,05$) (Gráfico 2A). A média da %AM para o GLP-1 foi ainda significativamente superior na região distal do intestino delgado (201 aos 700 cm) quando comparada com a região proximal (0 aos 200 cm) ($p<0,001$) (Gráfico 2B). Quando as amostras foram agregadas e agrupadas em 3 grupos (Gráfico 2C) manteve-se a diferença significativa de % AM entre o intestino proximal e distal, com uma média de %AM para o GLP-1 significativamente superior no grupo dos 201 a 700 cm comparativamente ao grupo dos 0 a 80 cm ($p<0,001$) e ao grupo dos 81 aos 200 cm ($p<0,05$). Quando agregadas e agrupadas em grupos intervalados de 100 em 100 cm verificou-se que a %AM para o GLP-1 era significativamente superior no segmento dos 401 a 500 cm ($p<0,001$) e no segmento dos 301 a 400 ($p<0,001$) comparativamente ao segmento dos 0 aos 100 cm (Gráfico 2D).

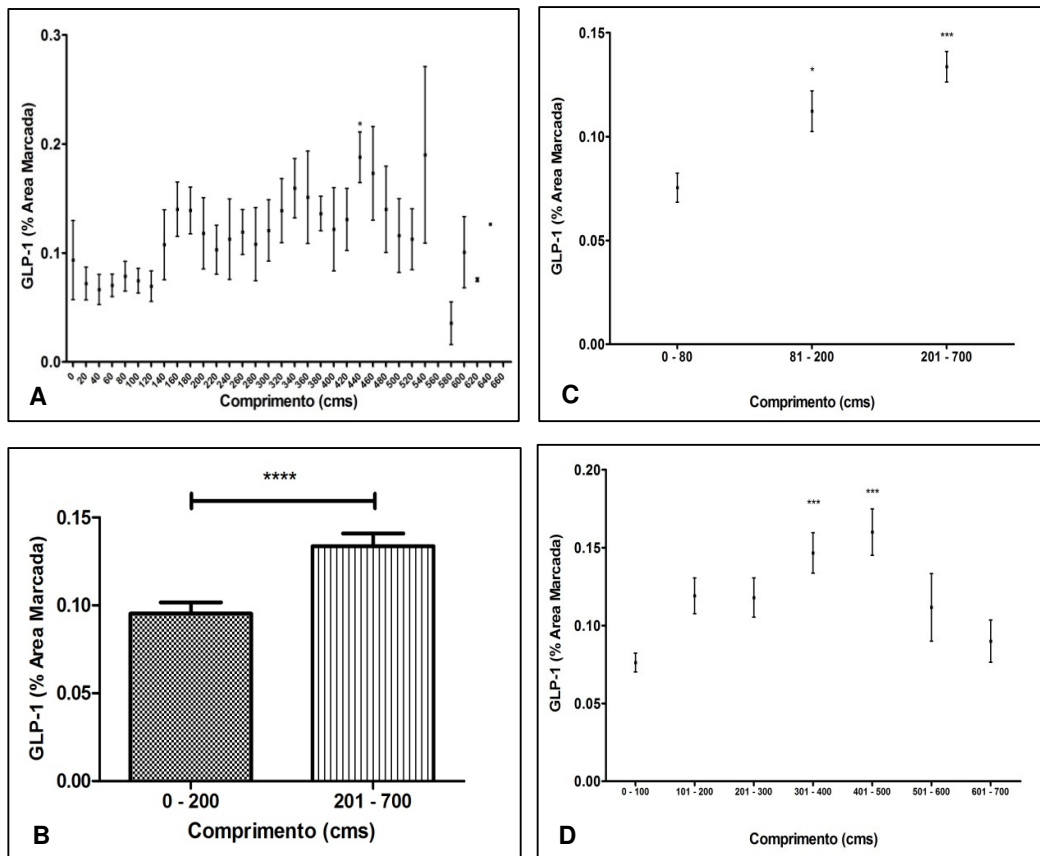


Gráfico 2. Percentagem de área marcada para o GLP-1. **2A-** Análise dos dados para os diferentes segmentos de intestino delgado de 20 em 20 cm (Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunns * $p<0,05$). **2B-** Dados agrupados: dos 0 aos 200 cm e dos 201 aos 700 cm (Man-Whitney U **** $p<0,0001$). **2C** – Dados agrupados: dos 0 aos 80 cm, dos 81 aos 200 cm e dos 201 aos 700 cm (Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunns * $p<0,05$; *** $p<0,001$). **2D-** Dados agrupados de 100 em 100cm (Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunns *** $p<0,01$).

Foi avaliada a razão entre a média da %AM do GLP-1 e da cromogranina A, verificando-se que a razão era significativamente superior ($p<0,001$) na região distal do intestino delgado (201 aos 700 cm) quando comparada com a proximal (0 aos 200 cm) (Gráfico 3A). A análise desta variável, distribuída por grupos intervalados de 100 cm, mostrou ser significativamente menor no grupo dos 0 aos 100 cm quando comparada com o grupo dos 401 aos 500 cm ($p<0,001$) e o grupo dos 301 aos 400 cm ($p<0,05$) (Gráfico 3B). Quando a variável foi analisada nas amostras agrupadas em 3 grupos (Gráfico 3C) verificou-se uma razão GLP-1/Cromogranina A significativamente maior no grupo dos 201 a 700 cm comparativamente ao grupo dos 0 a 80 cm ($p<0,001$) e ao grupo dos 81 aos 200 cm ($p<0,05$).

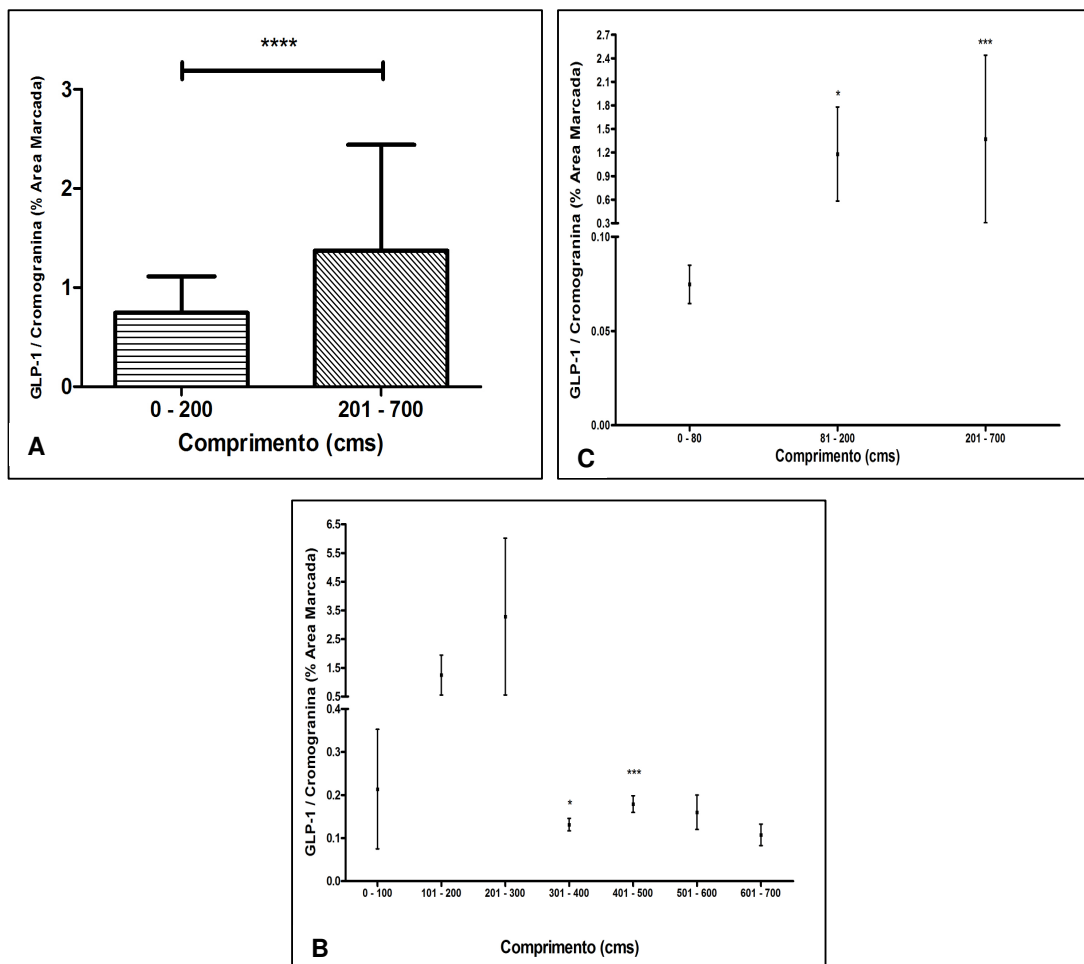


Gráfico 3. Razão entre a percentagem de área marcada para o GLP-1 e Cromogranina A. **3A** – Dados agrupados dos 0 aos 200 cm e dos 201 aos 700 cm (Mann-Whitney U **** $p<0,0001$). **3B**- Dados agrupados de 100 em 100 cm (Kruskall-Wallis com post-hoc de Dunns * $p<0,05$; *** $p<0,0001$). **3C**- Dados agrupados dos 0 aos 80, dos 81 aos 200 e dos 201 aos 700cm (Kruskall-Wallis com post-hoc de Dunns * $p<0,05$; *** $p<0,0001$).

Na análise da média da %AM para o GIP não existiram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) ao longo do intestino delgado (Gráfico 4), bem como para a relação entre a %AM do GIP comparativamente à cromogranina A (Gráfico 5A). Relacionando o GIP com o GLP-1 verifica-se que existem diferenças significativas ($p<0,05$) sendo a média da %AM superior na porção proximal (0 aos 200 cm) quando comparada com a porção distal (201 aos 700 cm) (Gráfico 5C). Perante a análise da razão entre a média da %AM entre o GLP-1 e o GIP, verifica-se que esta é superior no grupo dos 0 aos 80 cm ($p<0,05$) comparativamente ao grupo dos 201 aos 700 cm (Gráfico 5B).

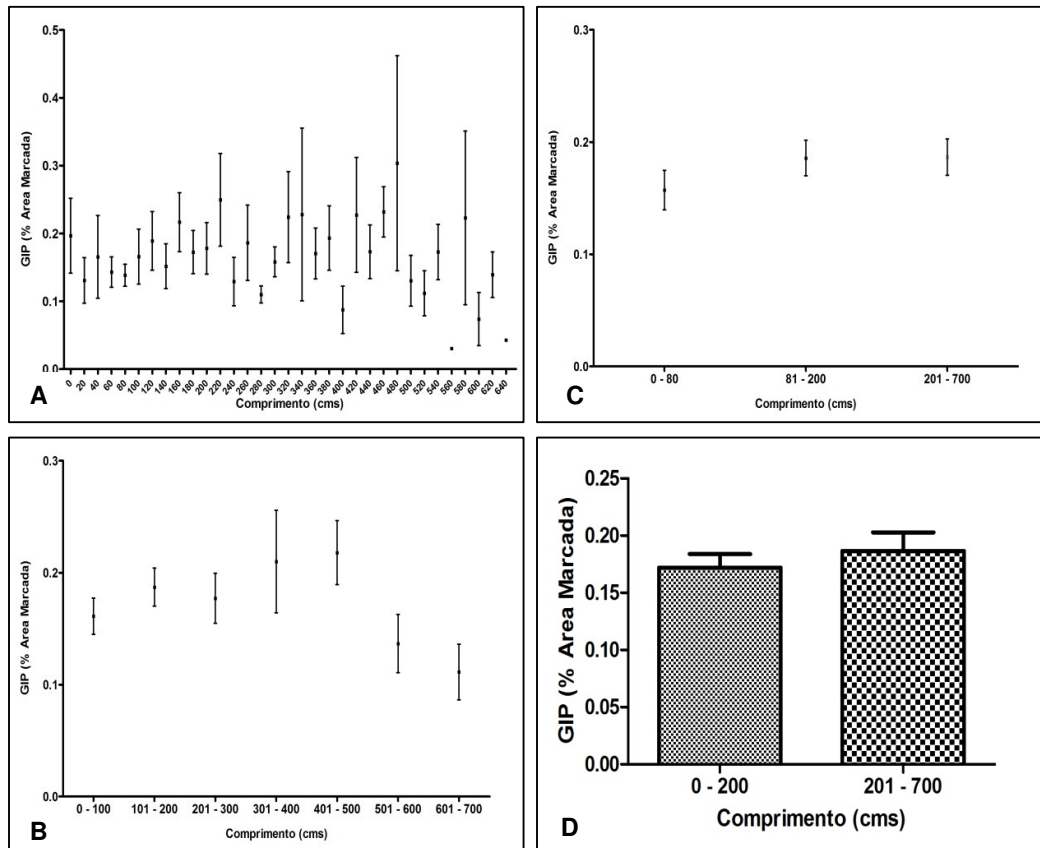


Gráfico 4. Percentagem de área marcada para o GIP. **4A**– Análise dos dados para os diferentes segmentos de intestino delgado de 20 em 20 cm. **4B**- Dados agrupados de 100 em 100 cm. **4C**- Dados agrupados: dos 0 aos 80 cm, dos 81 aos 200 cm e dos 201 aos 700 cm. **4D**- Dados agrupados: dos 0 aos 200 cm e dos 201 aos 700 cm.

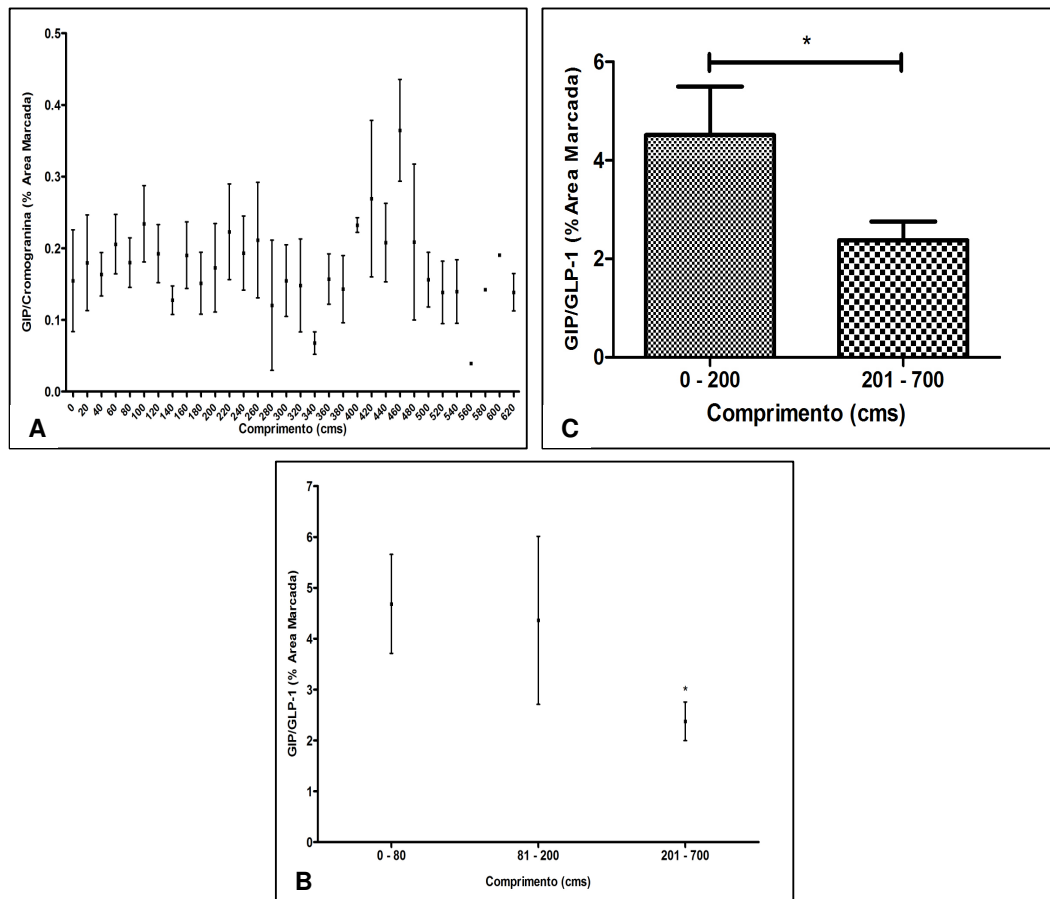


Gráfico 5. **5A-** Razão entre a percentagem de área marcada para o GIP e cromogranina A ao longo de 20 em 20 cm. **5B-** Razão entre a percentagem de área marcada para o GIP e o GLP-1 dos 0 aos 80 cm, dos 81 aos 200 cm e dos 201 aos 700 cm (Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunns * $p < 0,05$). **5C-** Razão entre a percentagem de área marcada entre o GIP e o GLP-1 dos 0 aos 200 e dos 201 aos 700 cm (Mann-Whitney U * $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Desde o início dos anos 70 é conhecido que a localização de células neuroendócrinas produtoras de incretinas ao longo do trato gastrointestinal tem uma distribuição preferencial na região proximal para as células K (produtoras de GIP) e na região distal para as células L (produtoras de GLP-1) (10, 11, 19). No entanto, este conhecimento deriva de estudos realizados em biópsias de intestino delgado obtidas no duodeno e no íleo terminal, sendo que não existe nenhuma referência na literatura quanto à caracterização sistemática da distribuição das células neuroendócrinas ao longo de todo o intestino delgado humano. O presente trabalho teve como objetivo colmatar essa lacuna e proceder à caracterização da distribuição relativa de células neuroendócrinas e células produtoras de incretinas ao longo de todo o jejuno-íleo humano. O conhecimento da anatomia do sistema incretinico tem como principal aplicação o contributo para melhor compreensão dos efeitos observados em doentes submetidos a cirurgia bariátrica, após a modificação anatómica do trato gastrointestinal associada às técnicas cirúrgicas de *bypass* gástrico, em particular no que respeita ao metabolismo glucídico e à melhoria do perfil metabólico apresentado pelos doentes diabéticos, assim como explicar potenciais diferenças na magnitude dos efeitos anti-diabéticos de variações introduzidas às técnicas clássicas de cirurgia bariátrica.

A média da percentagem da área marcada (AM) para o GLP-1, GIP e cromogranina A foram por nós avaliadas sistematicamente de 20 em 20 centímetros em todo o jejuno e íleo, e em conjuntos de fragmentos agrupados em dois grupos dos [0 aos 200 cm] e dos [201 aos 800 cm] e ainda em três grupos (dos [0 aos 80 cm], dos [81 aos 200 cm] e dos [201 aos 800 cm]), de modo a refletir a métrica utilizada na prática da clínica cirúrgica da obesidade.

A distribuição de células neuroendócrinas ao longo do intestino delgado que são imunoreativas para a cromogranina A não mostrou diferenças desde o ligamento de Treitz (início do jejuno) até à zona de corte mais próxima da válvula íleo-cecal (final do intestino delgado), traduzindo uma distribuição homogénea e constante das células neuroendócrinas ao longo de todo o intestino delgado.

A distribuição das células L, imunoreativas para o GLP-1, foi superior no intestino distal, comparativamente com o intestino proximal, nomeadamente no segmento entre os 301 e os 400 cm e no segmento entre os 401 e 500 cm, na qual a expressão de GLP-1 foi superior quando comparada com a do intestino proximal, nomeadamente dos 0 aos 100 cm. A expressão aumentada de GLP-1 na porção distal do intestino já tinha sido referenciada na literatura (60); no entanto, os resultados do presente estudo permitiram demonstrar que o aumento da expressão do GLP-1 é consideravelmente superior a partir

dos 200cm. A razão entre a percentagem de AM para o GLP-1 e a cromogranina A mostra-se igualmente aumentada na região distal, comparativamente com a região proximal do intestino delgado. Tendo em conta a inexistência de diferenças significativas na expressão da cromogranina A ao longo do intestino delgado, estes dados sugerem que, das células analisadas, as células L predominam efetivamente no intestino distal.

A distribuição de células K, imunoreativas para o GIP, mostrou que esta não variava ao longo do intestino delgado. No entanto, quando realizada a razão entre as percentagens de AM do GIP e GLP-1, indicativa da proporção relativa destas duas populações celulares, evidencia-se uma predominância das células K sobre as outras células na porção proximal. Quando analisada de forma agregada em 3 grupos, verifica-se que a predominância proximal das células K é principalmente devida à sua frequência aumentada entre os 0 aos 80 cm, comparativamente com o grupo entre os 201 aos 700 cm.

Tendo em conta descrições recentes sobre a existência de células capazes de secretar ambos os péptidos GIP e GLP-1 (10, 61), seria pertinente em estudos futuros avaliar também a distribuição intestinal destas células através da realização de técnicas de IHQ com dupla marcação de forma a melhor compreender a relação entre a expressão destes péptidos ao longo do intestino delgado.

Estima-se que atualmente exista um bilião de pessoas obesas em todo o mundo (62); mais de metade da população portuguesa (63) apresenta excesso de peso ou obesidade. A incidência globalmente crescente da obesidade e da diabetes *mellitus* tipo 2 é amplamente reconhecida como uma das maiores ameaças à saúde pública atual (64). As hormonas incretinas possuem vários efeitos fisiológicos antidiabéticos, dos quais se destacam a capacidade de influenciar positivamente a secreção de insulina pelas células beta do pâncreas (GIP e GLP-1) (13, 25) e negativamente as células alfa produtoras de glucagon (GLP-1) (7, 18). A nível extrapancreático é de destacar a interação destas hormonas com o sistema nervoso central resultando em regulação do apetite, saciedade e ingestão alimentar (3), bem como a influência no esvaziamento do trato gastrointestinal (33).

A abordagem inicial do tratamento da obesidade consiste na alteração dos hábitos alimentares, com diminuição da ingestão calórica, bem como no aumento do gasto energético-metabólico com o fomento da prática de exercício físico e o recurso a fármacos adjuvantes, quando necessário (65). A cirurgia da obesidade, ou cirurgia bariátrica, é utilizada para tratar casos de obesidade severa que não responderam às terapêuticas conservadoras, estando atualmente indicada para doentes com IMC ≥ 40 kg/m² ou IMC ≥ 35 kg/m² na presença de comorbilidades associadas à obesidade, tal como a diabetes (49, 66). O tratamento cirúrgico da obesidade compreende várias

técnicas bariátricas que podem induzir restrição da ingestão alimentar, malabsorção ou uma mistura de ambas. Com o emagrecimento obtido após a cirurgia verifica-se uma melhoria generalizada do controlo glicémico dos doentes diabéticos, podendo mesmo ocorrer a remissão clínica da doença (51). A taxa de remissão da diabetes varia com o tipo de técnica cirúrgica utilizada, sendo cerca de 48% para técnicas meramente restritivas, 95% para as técnicas malabsortivas e 84% para a técnica mista de que é exemplo o *bypass* gástrico em Y-de-Roux (BGRY) (51). Uma variação da técnica clássica BGRY, com a utilização de uma ansa biliopancreática mais longa do que no BGRY clássico (200 cm vs. 70 cm) (53), demonstrou induzir uma taxa de remissão da diabetes superior à previamente descrita na literatura para a técnica clássica (51) (92,68% vs 87,3%).

O comprimento médio do jejuno e íleo na nossa amostra é de cerca de cinco metros e meio o que não varia dos valores referidos em manuais de anatomia humana, tendo sido observada uma variação individual do comprimento de jejuno e íleo de 702 a 320 cm. Por outro lado, não foram encontradas correlações entre o comprimento do intestino delgado, IMC, diferenças de comprimento entre os dois sexos ou da expressão dos diferentes marcadores com o IMC, sexo ou idade dos cadáveres.

Os resultados obtidos no presente estudo relativamente à distribuição relativa de células imunoreativas para o GLP-1 no intestino delgado estão de acordo com a “hipótese do intestino distal” podendo explicar a melhoria do perfil glicémico destes doentes, através da modificação do trato gastrointestinal induzida pelo *bypass* gástrico, ao proporcionar uma exposição precoce das células L aos nutrientes com consequente hiperestimulação das mesmas, levando à produção aumentada de GLP-1 e outros de péptidos anorexigénicos como o PYY (47).

Os dados obtidos neste estudo sustentam estes achados uma vez que foi observada uma predominância de células L no segmento distal (dos 201 aos 700 cm) comparativamente com o segmento proximal (0 aos 200 cm). O fato de não terem sido encontradas diferenças nos grupos [0 a 80 cm] e [81 a 200 cm] mas terem sido encontradas diferenças entre os grupos [81 a 200 cm] e [201 a 700 cm] é a favor de uma maior eficácia da variação à técnica cirúrgica clássica com o recurso a uma ansa biliopancreática de 200 cm de comprimento com a construção da anastomose gastro-entérica a 200 cm distalmente do ligamento de Treitz (53), já que expõe de uma forma precoce a área intestinal com maior expressão de células produtoras de GLP-1. Assim sendo, e tendo em conta a prevalência da diabetes, cronicidade e custos associados ao controlo da doença, a cirurgia bariátrica poderá vir a ser considerada uma alternativa eficaz de tratamento da doença, independentemente do IMC do doente.

O conhecimento da localização de células produtoras de incretinas ao longo do intestino delgado humano poderá ainda ter interesse no desenvolvimento de formulações farmacológicas com o objetivo de estimular a produção endógena de incretinas, recorrendo a moléculas que atuem de uma forma mais seletiva nos segmentos intestinais com maior densidade celular.

O acesso a amostras biológicas provenientes de cadáveres foi escolhido tendo em conta a facilidade oferecida pela autópsia forense na obtenção da totalidade de intestino delgado, bem como a aquisição de segmentos da parede intestinal de uma forma sistemática comparativamente ao acesso de material que se pode obter através de biópsia. Como limitação citamos que, após observação microscópica tiveram que ser excluídos os cortes do tecido, principalmente do intestino distal, que apresentavam sinais de autólise e putrefação, uma vez que não foi estabelecido um tempo mínimo decorrido entre a morte do indivíduo e a realização da autópsia mas sim estabelecida a exclusão da amostra perante sinais macroscópicos major de putrefação. Uma forma de obviar esta limitação em estudos de caracterização fenotípica com recurso a técnicas de imunohistoquímica, e diminuir as perdas de material biológico, seria a utilização de material proveniente de dadores em morte cerebral, mantidos vivos com recurso a ventilação mecânica para transplante de órgãos.

CONCLUSÕES

As células imunoreativas para o GLP-1 apresentam uma expressão aumentada a partir dos 200 cm do ligamento de Treitz (início do jejuno), o que pode contribuir para explicar os resultados na melhoria do perfil metabólico e remissão da diabetes em doentes obesos submetidos a cirurgia bariátrica de *bypass* gástrico com ansa biliopancreática longa. Estes dados, juntamente com o conhecido efeito das hormonas incretinas no metabolismo glucídico, reforçam a possibilidade de otimizar a técnica cirúrgica em função das comorbilidades do doente obeso e de indicar a utilização desta cirurgia como alternativa terapêutica da diabetes, em doentes com IMC menores do que os que são atualmente estipulados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moore B. On the treatment of Diabetus mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. The Biochemical journal. 1906;1(1):28-38. Epub 1906/01/01.
2. Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. The gut hormones in appetite regulation. Journal of obesity. 2011;2011:528401. Epub 2011/09/29.
3. Gutierrez-Aguilar R, Woods SC. Nutrition and L and K-enteroendocrine cells. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity. 2011;18(1):35-41. Epub 2010/12/03.
4. Creutzfeldt W, Ebert R. New developments in the incretin concept. Diabetologia. 1985;28(8):565-73.
5. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. NEW INTERPRETATION OF ORAL GLUCOSE TOLERANCE. Lancet. 1964;2(7349):20-1.
6. Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. Journal of Clinical Investigation. 1967;46(12):1954.
7. Gautier JF, Choukem SP, Girard J. Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes. Diabetes & metabolism. 2008;34 Suppl 2:S65-72. Epub 2008/07/22.
8. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1986;63(2):492.
9. Vilsbøll T, Holst J. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. Diabetologia. 2004;47(3):357-66.
10. Mortensen K, Christensen LL, Holst JJ, Orskov C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. Regulatory peptides. 2003;114(2-3):189-96. Epub 2003/07/02.
11. Polak JM, Bloom SR, Kuzio M, Brown JC, Pearse AG. Cellular localization of gastric inhibitory polypeptide in the duodenum and jejunum. Gut. 1973;14(4):284-8. Epub 1973/04/01.
12. Salehi M, Aulinger BA, D'Alessio DA. Targeting beta-cell mass in type 2 diabetes: promise and limitations of new drugs based on incretins. Endocrine reviews. 2008;29(3):367-79. Epub 2008/02/23.
13. Vilsbøll T, Brock B, Perrild H, Levin K, Lervang HH, Kolendorf K, et al. Liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue, improves pancreatic B-cell function and arginine-stimulated insulin secretion during hyperglycaemia in patients with Type 2 diabetes

mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2008;25(2):152-6. Epub 2008/01/19.

14. Ehses JA, Casilla VR, Doty T, Pospisilik JA, Winter KD, Demuth HU, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide promotes beta-(INS-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. 2003;144(10):4433-45. Epub 2003/09/10.

15. Yip RG, Wolfe MM. GIP biology and fat metabolism. *Life sciences*. 2000;66(2):91-103. Epub 2000/02/09.

16. Ebert R, Creutzfeldt W. Influence of gastric inhibitory polypeptide antiserum on glucose-induced insulin secretion in rats. *Endocrinology*. 1982;111(5):1601.

17. Lewis JT, Dayanandan B, Habener JF, Kieffer TJ. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral glucose in rats: demonstration by a receptor antagonist. *Endocrinology*. 2000;141(10):3710.

18. Fehmann HC, Goke R, Goke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocrine reviews*. 1995;16(3):390-410. Epub 1995/06/01.

19. Varndell IM, Bishop AE, Sikri KL, Uttenthal LO, Bloom SR, Polak JM. Localization of glucagon-like peptide (GLP) immunoreactants in human gut and pancreas using light and electron microscopic immunocytochemistry. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1985;33(10):1080-6. Epub 1985/10/01.

20. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1409-39.

21. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131-57. Epub 2007/05/15.

22. Kreymann B, Ghatti MA, Williams G, Bloom SR. GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 7-36: A PHYSIOLOGICAL INCRETIN IN MAN. *The Lancet*. 1987;330(8571):1300-4.

23. Ørskov C, Wettergren A, Holst J. Secretion of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide correlates with insulin secretion in normal man throughout the day. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1996;31(7):665-70.

24. Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2004;287(2):E199-206. Epub 2004/07/24.

25. Qualmann C, Nauck MA, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W. Insulinotropic actions of intravenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1) [7-36 amide] in the fasting state in healthy subjects. *Acta diabetologica*. 1995;32(1):13-6. Epub 1995/03/01.

26. Abbott CR, Monteiro M, Small CJ, Sajedi A, Smith KL, Parkinson JR, et al. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain research*. 2005;1044(1):127-31. Epub 2005/05/03.
27. Jang HJ, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim BJ, Zhou J, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(38):15069-74. Epub 2007/08/29.
28. Trumper A, Trumper K, Trusheim H, Arnold R, Goke B, Horsch D. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Mol Endocrinol*. 2001;15(9):1559-70. Epub 2001/08/24.
29. Holst JJ. Glucagon-like peptide-1: from extract to agent. The Claude Bernard Lecture, 2005. *Diabetologia*. 2006;49(2):253-60. Epub 2006/01/18.
30. Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K, Holst JJ, Nauck MS, Ritzel R, et al. Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(3):1239-46. Epub 2002/03/13.
31. Xu G, Kaneto H, Lopez-Avalos MD, Weir GC, Bonner-Weir S. GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. *Diabetes research and clinical practice*. 2006;73(1):107-10. Epub 2006/01/13.
32. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, et al. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *The American journal of physiology*. 1997;273(5 Pt 1):E981-8. Epub 1997/12/31.
33. Spiller R, Trotman I, Higgins B, Ghatei M, Grimble G, Lee Y, et al. The ileal brake--inhibition of jejunal motility after ileal fat perfusion in man. *Gut*. 1984;25(4):365.
34. Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(3):515-20. Epub 1998/03/21.
35. Gutzwiller JP, Drewe J, Goke B, Schmidt H, Rohrer B, Lareida J, et al. Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *The American journal of physiology*. 1999;276(5 Pt 2):R1541-4. Epub 1999/05/08.
36. Naslund E, Barkeling B, King N, Gutniak M, Blundell JE, Holst JJ, et al. Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1999;23(3):304-11. Epub 1999/04/08.

37. D'Alessio D, Lu W, Sun W, Zheng S, Yang Q, Seeley R, et al. Fasting and postprandial concentrations of GLP-1 in intestinal lymph and portal plasma: evidence for selective release of GLP-1 in the lymph system. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;293(6):R2163-9. Epub 2007/09/28.
38. Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*. 1995;136(8):3585-96. Epub 1995/08/01.
39. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology*. 1999;140(11):5356-63. Epub 1999/10/28.
40. Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory peptides*. 1999;85(1):9-24. Epub 1999/12/10.
41. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Volund A, et al. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes*. 2007;56(8):1951-9. Epub 2007/05/22.
42. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1986;29(1):46-52. Epub 1986/01/01.
43. Jones IR, Owens DR, Luzio S, Williams S, Hayes TM. The glucose dependent insulinotropic polypeptide response to oral glucose and mixed meals is increased in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1989;32(9):668-77. Epub 1989/09/01.
44. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91(1):301-7. Epub 1993/01/01.
45. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2001;50(3):609-13. Epub 2001/03/15.
46. Willms B, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Nauck MA. Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996;81(1):327-32. Epub 1996/01/01.
47. Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(1):13-23. Epub 2007/01/04.

48. Residori L, Garcia-Lorda P, Flancbaum L, Pi-Sunyer FX, Laferrere B. Prevalence of co-morbidities in obese patients before bariatric surgery: effect of race. *Obesity surgery*. 2003;13(3):333-40. Epub 2003/07/05.
49. Dixon JB, Zimmet P, Alberti KG, Rubino F. Bariatric surgery: an IDF statement for obese Type 2 diabetes. *Surgery for Obesity and Related Diseases*. 7(4):433-47.
50. Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE, Carlson MJ. Role of the bypassed proximal intestine in the anti-diabetic effects of bariatric surgery. *Surgery for obesity and related diseases : official journal of the American Society for Bariatric Surgery*. 2007;3(2):109-15. Epub 2007/03/28.
51. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2004;292(14):1724-37. Epub 2004/10/14.
52. Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, Cottam D, Gourash W, Hamad G, et al. Effect of laparoscopic Roux-en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. *Annals of surgery*. 2003;238(4):467-84; discussion 84-5. Epub 2003/10/08.
53. Nora M, Guimaraes M, Almeida R, Martins P, Goncalves G, Freire MJ, et al. Metabolic laparoscopic gastric bypass for obese patients with type 2 diabetes. *Obesity surgery*. 2011;21(11):1643-9. Epub 2011/04/23.
54. Pories WJ. Diabetes: the evolution of a new paradigm. *Annals of surgery*. 2004;239(1):12-3. Epub 2003/12/20.
55. Pories WJ, Albrecht RJ. Etiology of type II diabetes mellitus: role of the foregut. *World journal of surgery*. 2001;25(4):527-31. Epub 2001/05/10.
56. Rubino F, Gagner M. Potential of surgery for curing type 2 diabetes mellitus. *Annals of surgery*. 2002;236(5):554-9. Epub 2002/11/01.
57. Aguirre V, Stylopoulos N, Grinbaum R, Kaplan LM. An endoluminal sleeve induces substantial weight loss and normalizes glucose homeostasis in rats with diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(12):2585-92. Epub 2009/03/13.
58. Rubino F. Is type 2 diabetes an operable intestinal disease? A provocative yet reasonable hypothesis. *Diabetes care*. 2008;31 Suppl 2:S290-6. Epub 2008/02/15.
59. Service GJ, Thompson GB, Service FJ, Andrews JC, Collazo-Clavell ML, Lloyd RV. Hyperinsulinemic hypoglycemia with nesidioblastosis after gastric-bypass surgery. *The New England journal of medicine*. 2005;353(3):249-54. Epub 2005/07/22.
60. Eissele R, Goke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, et al. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European journal of clinical investigation*. 1992;22(4):283-91. Epub 1992/04/01.
61. Theodorakis MJ, Carlson O, Michopoulos S, Doyle ME, Juhaszova M, Petraki K, et al. Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and

GIP. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2006;290(3):E550-9. Epub 2005/10/13.

62. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(9):1431-7. Epub 2008/07/09.

63. do Carmo I, Dos Santos O, Camolas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, et al. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2008;9(1):11-9. Epub 2007/11/24.

64. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 2011;378(9785):31-40. Epub 2011/06/28.

65. Health Nlo. The practical guide: identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. Bethesda, MD: National Institutes of Health; 2000.

66. Brolin RE. Update: NIH consensus conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 1996;12(6):403.